

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-503127

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月6日

(51)Int.Cl.\*  
C 12 N 5/06

識別記号

序内整理番号

F I

8412-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-507906  
(86) (22)出願日 平成4年(1992)10月22日  
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)4月25日  
(86)国際出願番号 PCT/US92/09019  
(87)国際公開番号 WO93/08268  
(87)国際公開日 平成5年(1993)4月29日  
(31)優先権主張番号 780,488  
(32)優先日 1991年10月23日  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, SE), CA, JP

(71)出願人 セルプロ インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 ワシントン州 98021  
ボセル アベニュー サウスイースト  
22322  
(72)発明者 ハイムフェルド シエリー  
アメリカ合衆国 ワシントン州 98072  
ウッディンヴィル ノースイースト ワン  
ハンドレッドアンドナインティエイス ス  
トリート 18326  
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】幹細胞を選択的に増加する方法

(57)【要約】

(a)幹細胞を他の細胞から分離する工程、及び(b)幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。

特表平7-503127 (2)

- 請求の範囲
- 1.(a) 幹細胞を他の細胞から分離すること、及び
    - (i) 幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートすること
 を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法。
  - 2.(a) 幹細胞を成熟細胞から周期的に分離すること、及び
    - (i) 幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートすること
 を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法。
  3. 選択された培養基で幹細胞成長因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  4. 選択された培養基がインターロイキン-3を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  5. 選択された培養基が顆粒球-マクロファージコロニー刺激性因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  6. 選択された培養基が顆粒球コロニー刺激性因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  7. 選択された培養基がインターロイキン-6を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  8. 選択された培養基が肥満細胞成長因子を含む請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  9. 幹細胞がアフィニティカラムで分離される請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  10. 幹細胞がフローサイトメトリーにより分離される請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  11. 分離された幹細胞がペトリ皿中でインキュベートされる請求の範囲第1項又は第2項の方法。
  12. 分離された幹細胞が滅菌パック中でインキュベートされる請求の範囲第1項又は第2項の方法。

明細書  
幹細胞を選択的に増加する方法

関連出願との相関

本出願は、1990年4月23日に出願された米国特許出願第シリアルNo 07/513,543の一関連出願である。

技術分野

本発明は、一般に、骨髄を構成する細胞に関するものであり、また特に、幹細胞の数を選択的に増大させるのに用いられる装置及び方法に関するものである。

発明の背景

癌は、全世界における全死亡者の5分の1より多くの原因であり、死亡原因の第2位である。男性における癌の主なタイプは、肺、直立腺、及び結腸直腸癌であり、女性においては乳、肺及び結腸直腸癌である。最近では、多くの癌は、外科的治療ならびに化学療法及び/又は放射線療法の組合せで処置される。

しかし、化学療法と放射線療法における一つの困難は、これが個人の免疫系、ならびに免疫系の先祖細胞である幹細胞をも破壊することにある。免疫系を再構築するために、患者は一般に同種の又は自己の骨髄を用いて骨髄移植される。しかし、多くの個人は、自身の骨髄が癌に侵されているか又は組織適合の供体者が見つからないために、死亡する。

この困難を克服するために示唆された一つの方法は、移植する細胞の寿命を延長する、長期骨髄培養の使用である。たとえば、デクスター等 (J. Cell. Phys. 91: 335, 1976) は、インビトロで幹細胞を増殖するための条件を記載している（以下では、デクスター培養と云う）。簡単に云えば、この方法は、基質細胞の粘着性層の形成を含み、これは幹細胞及び初期先祖細胞の生育を支持する。しかし、デクスター培養は結局のところ欠点がある。なぜなら、それは、幹細胞及び初期先祖細胞の死亡速度を低下するのみであって、そのような細胞の数の増大という望まれる結果を与えないからである。

本発明は、幹細胞を選択的に増加する装置及び方法を提供する。これら装置及び方法は、従来の装置及び方法の欠点を克服し、かつ更に他の関連する利点を有す

る。

発明の概要

簡単に云えば、本発明は、幹細胞を選択的に増加するため及び成熟造血細胞を得るために装置及び方法に向けられている。本発明の一例において、(a)幹細胞を他の細胞から分離する工程、及び(b)幹細胞が選択的に増加されるよう選択された培養基中で、分離した幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。本発明の別の面において、(a)幹細胞を成熟細胞から周期的に分離する工程、及び(b)幹細胞が選択的に増加されるよう選択された培養基中で、分離した幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。種々の実施形態において、選択される培養基は、幹細胞成長因子、インターロイキン-3、顆粒球-マクロファージコロニー刺激性因子、顆粒球コロニー刺激因子、インターロイキン-6、または肥満細胞成長因子を含有する。

他の実施形態において、幹細胞は、アフィニティカラムで、又はフローサイトメトリー（フロー式血球計算）によって分離される。更に別の実施形態において、分離された幹細胞は、ペトリ皿、滅菌パック又は中空織維中でインキュベートされる。

本発明の別の実施形態において、(a)幹細胞を他の細胞からアフィニティカラム上で分離する工程、及び(b)幹細胞成長因子、インターロイキン-3、及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子を含む培養基を有する滅菌パック中で、分離した幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。

本発明のこれらの面及び他の面が、以下の詳細な説明及び図面を参照して明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、幹細胞増加における幹細胞分離の効果を、合計細胞数の増加により測定して示すグラフである。

図2は、幹細胞増加に対する幹細胞分離の効果を、CFCの増加により測定して示すグラフである。

### 特表平7-503127 (3)

図3は、合計細胞数に対する種々の成長因子の効果を示すグラフである。  
図4は、CFCの数に対する種々の成長因子の効果を示すグラフである。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、幹細胞を選択的に増加させるための装置及び方法を提供する。本発明の文脈において、「幹細胞」という言葉は、全能性を有する (totipotent) 造血細胞ならびに初期先祖細胞たとえばコロニー形成性細胞 (CFC) を云う。これら細胞は、CD34 レセプターの存在に基づき、他の細胞から区別されうる。

上記のように、本発明の一面向において、(a)幹細胞を他の細胞から分離する工程、及び(b)幹細胞を増加させることのできる選択された培養基を用いて、分離された幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加する方法が提供される。

下記により詳しく記述される装置及び方法を用いて、たとえば未梢血及び骨髄を含め種々の血液プロダクトから幹細胞を分離されうる。本発明の目的のために、分離された細胞の少くとも 20% が CD34 階性細胞であるならば、幹細胞が分離されたと考えられる。好ましくは、CD34 階性細胞は、90% より大きい割合をえるように分離される。加えて、移植する細胞の回収及び生育を低下する凝成性酵素の放出、及び酵素を防ぐために、血小板、顆粒白血球及び赤血球の合計数を出来るだけ小さく保つことが望ましい。より詳しくは、幹細胞が、約 1% 未満の血小板、5.0% 未満、好ましくは約 2.5% 未満の顆粒白血球、及び 1.0% 未満、好ましくは約 1% 未満の赤血球を含むことが望ましい。

幹細胞の分離は、これら細胞上の抗原を特異的に認識するリガンドの使用により達成されうる。たとえば、CD34 抗原を特異的に認識する抗体を、下記の装置及び方法で用いて、幹細胞を分離できる。CD34 抗原を特異的に認識する抗体の代表例は、My-1.0 及び HPCA-2 (ペクトンディッキンソン、マウンテンビュー カリフォルニア) 及び 12-8 (セルプロ (商標)、ボセル、ワシントン) である。

磁気ビーズ、平皿洗い (panning)、及びフローサイトメトリー (蛍光活性化細胞分離「FACS」) (たとえば米国特許明細書第 4,714,680 号及び 4,985,204 号参照: これらは引用することにより本明細書に含まれる) の使用を含む種々の

方法及び装置が、幹細胞を分離するために用いられる。特に好ましい方法及び装置は、「免疫選択装置及び方法」という名称の米国特許出願シリアル No. 07/513,543 (引用することによりその全体が本明細書に含められる) に記載されているようなイムノアフィニティ カラムである。簡単に云えば、この出願は、幹細胞のような標的粒子を、非標的粒子と標的粒子の混合物から単離又は分離する方法及び装置を記載している。標的粒子に特異的に結合することができるリガンドを持つ、低度非特異的結合性の多孔性物質の床を含むカラムに粒子を通過させることにより、直接的方法で標的粒子が分離される装置及び方法のディスカッションがこの出願に含められる。この出願の一面において、(a)液体がそこを通してカラムに入りうる入口穴を有する基部端、及び液体がそれを通ってカラムから出る出口穴を有する末梢端を有するカラム、(b)カラム内に低度非特異的結合性の多孔性物質の床を一般に有し、該多孔性物質はその表面に固定化されたビオチン吸着基を有するところの親和性を提供され、ここで多孔性物質の孔のサイズは、ビオチン吸着性基が孔に入ることを許すのに十分であり、しかし次の崩壊を許す程に大きくなり、また床の間隔のサイズは粒子が床を通過するのを許すのに十分である。該装置は更に、結合された標的粒子が多孔性物質から開放されるように外部力を加えて多孔性物質を操作するための手段をカラム内に有する。この出願の他の面において、標的粒子は、アビシン及びビオチンを用いる一段階又は二段階法により分離される。しかし、本発明の目的のためには、イムノアフィニティ カラム内でたとえば非多孔性物質のような他の物質を用いることを注意しておく。

特に好ましいイムノアフィニティ カラムは、「細胞分離のための改善された装置及び方法」という名称の米国特許出願 (代理人のドケット No. 20072.407) (引用することにより、他の全体を本明細書に含める) に記載されている。簡単に云えば、この出願の一面において、試料液体から標的細胞を分離するためのカラム組立体を含む「細胞セパレーター」が提供され、カラム組立体は、カラム、試料液体供給バッグ、及び液体収集バッグを含み、ここでカラムは試料液体供給バッグから試料液体を受け取り、試料液体から標的細胞を分離し、そして標的細胞を保持するために備えられ、また液体収集バッグはカラムから放出された後の

標的細胞を受け取るために備えられている。該細胞セパレーターは、カラム内に保持された試料細胞の放出を助けるためにカラム内容物を攪拌するための攪拌手段 (該攪拌手段は、試料細胞が放出される速度を変えるためにカラム内容物の攪拌の量を変えるための駆動シグナルに応答する)、カラムから流出して液体収集バッグに流入する液体の光学密度を示すカラムシグナルを与えるためのカラムセンサー手段、カラムから流出する液体が選択的に液体収集バッグへ流入できるようにするカラムバルブ制御シグナルに応答するカラムバルブ手段、及び細胞セパレーターの運転を制御するためのデータ処理手段 (該データ処理手段は、駆動シグナルを与えるためのカラムシグナル、及び不十分な濃度の標的細胞が集められることを防ぐためのカラムバルブ制御シグナルに応答する) を含む。この発明の一実施形態は、セルプロ (ボセル、ワシントン) から入手できる CEPRATE LC (商標) 細胞分離システムである。

分離された細胞は次に、幹細胞が選択的に増加されるように選択された培養基中でインキュベートされる。本発明の文脈において、幹細胞の数が、他の細胞タイプ全般よりも増加するなら、幹細胞は「選択的に増加」される。簡単に云えば、栄養基は、細胞生育を維持する栄養基、ならびに幹細胞の数を増加する因子を含まねばならない。栄養基の代表例は、RPMI、TC 199 又は iscove DMEM であり、これらは蛋白質たとえば胎児ウシ血清を補われている。あるいは、栄養基は、Ex Vivo のような規定された培養基でありうる。種々の成分が、幹細胞を選択的に増加させるために用いられる。代表的な因子は、インテロイキン-1、インテロイキン-3、インテロイキン-4、インテロイキン-6、インテロイキン-7、SCF、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、TGF-β、TNF-α、α-INF、FGF、PDGF、IGF-1、及び IGF-2 を含む。特に好ましい因子は、幹細胞成長因子 (アムゲン、サウザンド、オーフィス、カリブルニア)、インテロイキン-、顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子 (イムネックス、シートル、ワシントン)、顆粒球コロニー刺激因子、イタロ-ロイキン-6 (アムゲン、サウザンド オーフィス、カリブルニア) 及び肥満細胞成長因子 (イムネックス、シートル、ワシントン) を含む。

上記のように幹細胞を精製し、それを選択された培養基と共に後記のようにインキュベートすることによって、培養基が選択的に幹細胞を増加させるか否か容易に決定できる。幹細胞及び他の細胞の数は、インキュベーションの前に及び後にカウントされる。上記のように、もし幹細胞の数が増大し、他の細胞がそうでないなら、幹細胞は選択的に増加された。細胞の合計数は、標準的な手法 (たとえば血球計数器) によりカウントでき、幹細胞の数は、フローサイトメトリー (すなわち、強光的に結合された抗 CD34 抗体でラベルされた細胞が FACS によりカウントされる)、又は実施例 3 で後述のようにカウントされる。

分離された細胞は、種々の容器でインキュベートされる。特に好ましい容器は、ベトリ皿 (コーニンググラス、ワーラー、コーニング、ニューヨーク)、6 穴プレート (コスター)、ガス透過性滅菌パックたとえば Stericell (テルモ、エルクトン、メリーランド) 及び Lifecell (バクスター、デアフィールド、イリノイ)、及び中空滅菌したとえば Cellphar II (ユニシンド、ファイバティック、サンジエゴ、カリブルニア)、Accusys (エンドトロニクス、ミネアポリス、ミネソタ)、又は Vitaliber (アミコン、ダンバース、マサチューセッツ) を含む。好ましくは、細胞は 5% ~ 10% CO<sub>2</sub> の雰囲気かつ約 37 °C の温度でインキュベートされる。

本発明の他の面において、(a)幹細胞を成熟細胞から周期的に分離する工程、及び(b)幹細胞を選択的に増加させるよう選択された培養基中で、分離された幹細胞をインキュベートする工程を含む、幹細胞を選択的に増加させる方法が提供される。簡単に云えば、成熟細胞 (これは、最終的に分化された血細胞のみでなく、中间的な系統をも含む) は、幹細胞の増加及び分化をフィードバック制御メカニズムを介して禁止すると考えられる。すなわち、培養基からの成熟細胞の除去は、幹細胞の元の数の何倍もの幹細胞の増加を許す。本発明の文脈において、周期的分離は、少くとも 10 日毎に成熟細胞の除去を意味する。

周期的に幹細胞を分離するために、種々の方法が用いられている。たとえば一実施形態において、細胞が上記のようにアフィニティカラム上で分離され、上記の容器のいずれかを用いて、選択された培養基中でインキュベートされ、そして次に、新たに分離された成熟細胞から幹細胞を分離するために再分離される。

本発明の別の面において、幹細胞が選択的に増加されるように選択された培養基を灌流しながら、幹細胞を連続的に分離する。簡単に云えば、一実施形態において、これは分離装置（たとえば上記のアフィニティカラム）に選択された培養基を連続的に灌流することにより行われる。幹細胞は分離装置中に保持され、一方、成熟細胞（これはCD 3 4 抗原を持たない）は装置を通過する。幹細胞が成長し、数が増大すると、新しい幹細胞は同様の分離装置に付くし、一方、新たに分化した、CD 3 4 抗原を有しない細胞は装置を通過する。

本発明の別の実施形態において、成熟細胞上に見られる表面抗原に対する固定化されたリガンドを用いてコーティングされたビーズを灌流室に通過させることにより、幹細胞は灌流装置中で連続的に分離される。従って、成熟細胞が結合され、ビーズにより灌流室から選び去られる。

下記の実施例は、例示のためのものであり、限定するためのものではない。

#### 実施例

#### 実施例 1

##### アビジン化されたバイオゲルの調製

###### A. ポリアクリルアミドゲルのカルボキシル化

17 g の乾燥バイオゲル P-60 (50~100 メッシュ (粗)、粗ビーズ) (バイオラド、カタログ No. 150、1630、リッチモンド、カリフォルニア) を、1.5 リットルの 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> / 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> に加える。NaOH を用いて pH を 10.5 に調節し、ビーズを抜けないように注意深く約 20~30 分間、ミキサー (RZR 1、カルファモ、ウイアントン・オンタリオ、カナダ) で混合する。ミキサーを次に、80°C 水浴中に置く。混合物が 60°C に達した後、それをたまに攪拌しながら更に 2 時間 (60°C) インキュベートする。混合物を次に水浴から取り出し、水浴中に入れて混合物温度を室温へ下げる。

蒸留水又は脱イオン水を用いてビーズを数度洗い、次に真空中に接続された粗ガラスフィルターを用いて PBS で数度洗う。該カルボキシル化されたゲルは PBS 中で 4°C で貯蔵でき、もし滅菌されるか否は保存剤と共に貯蔵されるなら 1 年間まで安定である。

###### B. カルボキシル化されたバイオゲルのアビジン結合

まず、真空中に接続された粗ガラスフィルターで滤過することにより、測定された量のカルボキシル化バイオゲルから PBS を除去する。ゲルを次に、蒸留水又は脱イオン水中で 1.5~3.0 分間平衡化する。水中での平衡化は、予め測定した体積の約 4 倍へのゲルの膨脹を起す。ゲルの 1 mL 当り (PBS 中で当初測定)、蒸留水又は脱イオン水の 1.0 mL 中にゲルを再懸濁する。

当初測定したゲルの 1 mL 当り 3~4 mL の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミド (EDC-HCl) (シグマケミカル社、カタログ No. E 7750、セントルイス、ミズーリ) を加える。HCl を滴下することにより pH を迅速に 5.5 に調節する。pH を 5.5 に維持するよう注意する；5.0 未満又は 6.0 より大きい pH は、バイオゲルの著しく小さい活性化を結果とする。混合物を 5 分間搅拌する。

アビジン (インターナショナル エンザイムズ社、フォールブロック、カリifornia) を、脱イオン水に 1.0~1.00 mM の濃度で溶解する。次に、ゲルの 1 mL (PBS 中で当初測定) 当り 1 mg のアビジンを迅速に加える。混合物を 1.5 時間搅拌する。次に 2 M のグリシンを加えて、混合物において 0.2 M グリシンの最終濃度にし、更に 1 時間搅拌する。

粗ガラスフィルター及び真空を用いて、ゲルを数体種量の PBS で洗い、4°C で PBS 中で貯蔵する。ゲルは、約 1 年間安定である。

#### 実施例 2

##### 移植する細胞の単離

###### A. 脾皮脂細胞 (buffy coat cell) の調製

骨髓の試料を 240 × g で 1.5 分間遠心分離する。血漿を除き (後の使用のために保持しておく)、そして残った脾皮脂細胞を再び 240 × g で 1.5 分間遠心分離して、赤血球細胞を除く。脾皮脂細胞を、RPMI を用いて 80 × g、10 分間の遠心分離により二度洗う。次に細胞を再懸濁して、RPMI + 1% BSA の 1 mL 中 1 × 10<sup>6</sup> 白血細胞の最終濃度とする。

###### B. 脾皮脂細胞と抗体とのインキュベーション

###### C. 脾皮脂細胞の懸濁物、ビオチン化した (biotinylated) 抗 CD 3 4 抗体

(Cellpro、ボセル、ワシントン) の 2.0 μg/mL の最終濃度で、室温で 2.5 分間インキュベートする。次に抗体-細胞混合物を、PBS を用いて 180 × g で 1.0 分間遠心分離して洗う。細胞を次に再懸濁して、PBS 1 mL 中 1 × 10<sup>6</sup> 白血細胞の濃度とする。

#### C. カラム操作及び結果

C E P R A T E L C (商標、ボセル、ワシントン) 分離系を、製造者の指示に本質的に従って用いた。簡単に云うと、装置をセットアップし、チューブを接続し、試験を接続し、抗体処理された細胞を用いて実験を始めた。細胞は、ポンプによってカラムに通され、カラムは PBS で洗われ、そして、吸着された細胞は磁気駆動インペラーによって放出された。吸着された細胞は、収集バッグ中に蓄積された。

#### D. 結果

1.0 億個の骨髄細胞がカラムを通過された：

2 億個の細胞がカラムに結合され、収集バッグ中に回収された。収集された細胞の生産性は、トリバンブルー排除により測定して、91% であった。収集された細胞は、FACS 分析によると、7.5% CD 3 4<sup>+</sup> であった。

#### 実施例 3

##### CFC 生産性の測定及び回収

2 mM の L-グルタミン及び 5.0 ng/mL のゲンタマイシンを補われた Iscove のメチルセルロール (テリーフォックスラボラトリーズ、パンクーバー、ブリティッシュ コロンビア、カナダ) の、3.5 mL プレート当り 1 mL を 37°C に温めた。アッセイの精度を改善するために、細胞を 3 倍希釈で 3 層にプレートした。プレートされた細胞の最大数は、1.0<sup>6</sup> / プレートであった。但し、カラム精製された細胞は、3 × 1.0<sup>6</sup> 及び未満でプレートされた。細胞を各プレートの表面に均一にスプレーし、37°C で 5% CO<sub>2</sub> の空気中で 10~14 日間、加湿インキュベーター中でインキュベートした。コロニーが 50 より多い細胞を含んでいたら、コロニーをカウントし、CFU-GM、BFU-E 又は他 (たとえば CFU-GEMM) として記録された。種々のタイプのコロニーの数は合計されて、コロニー形成性細胞 (CFC) の合計数を与える。

#### 実施例 4

##### 幹細胞増加

###### A. 分離された幹細胞と全骨髄中の幹細胞との増加の比較

実施例 2 記載のように精製された幹細胞を、RPMI 1640、10% 脱児ウシ血清 (HYCLONE、ロガン、ユタ)、5.0 ng/mL 幹細胞成長因子、5.0 ng/mL インターロイキン-3、2.0 ng/mL 頸粒球-マクロファージコロニー刺激性因子、及び 2.0 ng/mL 頸粒球コロニー刺激性因子を含む培養液で成長させた。細胞は、培養基 1 mL 中、プレート当り 1.0<sup>6</sup> でプレートされた。第 7、14 及び 21 日に細胞を取扱い、実施例 3 記載のように CFC アッセイのための再プレートした。生育性細胞を、トリバンブルーを用いる血球計数器によりカウントした。

図 1 で合計細胞カウントにより示されるように、及び図 2 で CFC の数により示されるように、細胞を培養する前の幹細胞分離は、幹細胞成長及び増加を劇的に改善した。

###### B. 幹細胞増加を起こす因子

幹細胞を増加させるためにどの成長因子が有用であるかを決めるために、下記のアッセイを行った。簡単に云え、上記のように精製された幹細胞を、コニング 3.5 mL プレート中のプレート当り 1.0<sup>6</sup> 細胞の密度でプレートした。該細胞に、10% 脱児ウシ血清及び下記の成長因子の種々の組合せを補われた RPMI 1640 を含む液体を加えた。

(1) 5.0 ng/mL 幹細胞成長因子 (アムゲン、サウザンドオース、カリフォルニア)、(2) 5.0 ng/mL インターロイキン-3、(3) 2.0 ng/mL 頸粒球-マクロファージコロニー刺激性因子 (イムネックス、シアトル、ワシントン)、及 U41 頸粒球コロニー刺激性因子 (ゲンザイム、ケンブリッヂ、マサチューセッツ)。

図 3 及び 4 に示されるように、SCF を含む二つの培養基は幹細胞を増加させた (CFC 数の増加で判定して)。

上記から、本発明の特定の実施形態が、例示のためにここに記述されたが、種々の変更が本発明の精神及び範囲からそれることなくなされうることが理解される。従って、本発明は添付の請求の範囲によってのみ限定される。

FIG. 1

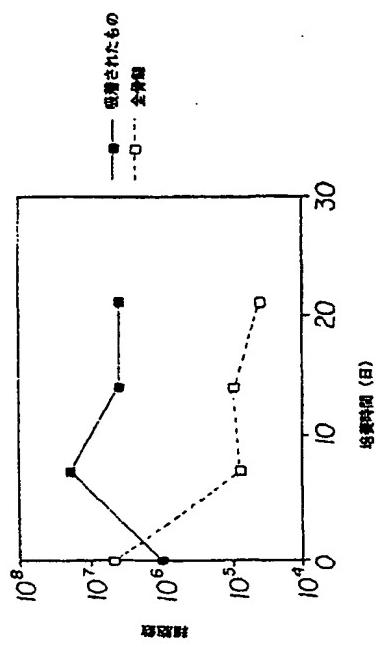


FIG. 2

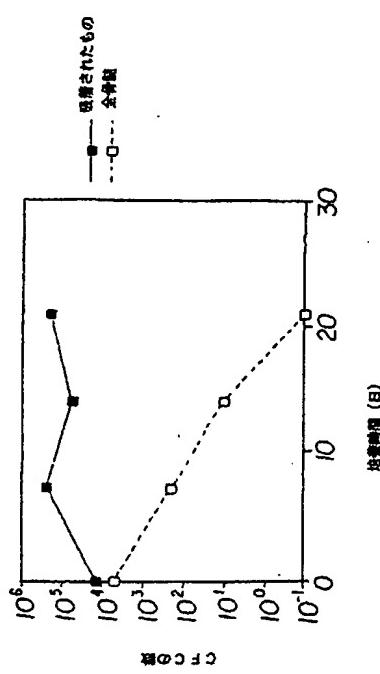


FIG. 3

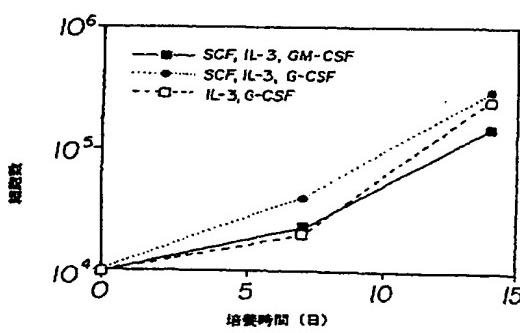
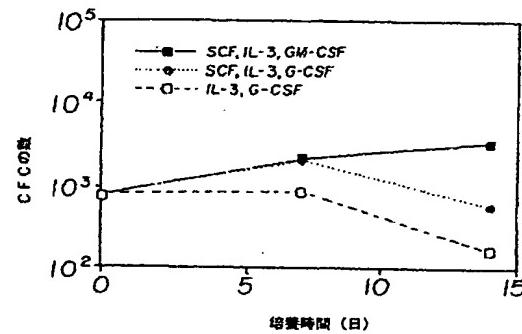


FIG. 4



国際調査報告

International Application No. PCT/US 92/09019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Or general classification (specify code, reference cited) according to International Patent Classification (IPC) or to International Classification and CPC		
Int.C1. 5 C10N/08		
B. PRIOR SEARCHED Number of documents examined		
Classification System Classification Symbols		
Int.C1. 5	C10N 1/ 461K	
Information Received other than International Publications in the Course of said Examination are included in the Prior Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category <sup>1</sup> Citation of Document, " and Invention, where appropriate, of the relevant passages <sup>2</sup> Submitted in Class No. <sup>3</sup>		
X	EP-A-0 341 966 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LEELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 15 November 1989 see page 4, line 56 - page 5, line 12; claims	1-14
X	EP-A-0 451 811 (SYSTEMIX, INC.) 16 October 1991 see page 6, line 14 - line 23; claims	1-14
P,X	EP-A-0 455 402 (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 6 November 1991 see page 8, line 20; claims 1-8,16,17,20,21	1-14 -/-
<sup>1</sup> General indicator of cited document(s) <sup>2</sup> A document relating to the present state of the art which is not considered to be of particular relevance to the examination of the application <sup>3</sup> Indication of the class or subclass of the international classification or CPC in which the document is cited		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Filing of this International Search Report	
28 JANUARY 1993	18. (1) 93	
International Searching Authority	Signature of International Examiner	
EUROPEAN PATENT OFFICE	RYCKEMANSCH A.D.	

International Application No. PCT/US 92/09019

B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CITIFIED FROM THE SECOND SHEET)		
Category <sup>1</sup>	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant portions	
P,X	WO-A-9 201 079 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE ET AL.) 22 January 1990 see page 4, line 14 - page 5, line 28; claims 1-13; example 3 see page 9, line 7 - line 27	1-14

See PCT Rule 14(3)(a) and Annex IV(2)

## 国際調査報告

US 8209019  
SA 66411

This search lists the patent family members existing in the prior art documents cited in the above-mentioned International search report.  
The number of the document in the European Patent Office (EPO) file is 14/092/93  
The European Patent Office is to be very brief for other purposes which are not giving place for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family membership	Publication date
EP-A- 0341966	15-11-89	US-A- 5007570 JP-A- 2042978	13-02-92 13-02-90
EP-A- 0451811	16-10-91	US-A- 5051620 AU-A- 7398691	29-10-91 03-10-91
EP-A- 0455402	06-11-91	AU-A- 7423391	07-11-91
WO-A- 9201039	23-01-92	US-A- 5154921	18-10-92

For more details about this search, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

## フロントページの続き

(72) 発明者 ベレンソン ロナルド ジェイ  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98040  
 マーサー アイランド エイティフォース  
 アベニュー サウスイースト 6127  
 (72) 発明者 フェイ ルイガオ  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98115  
 シアトル 1 トゥエンティサード アベ  
 ニュー ノースイースト 8519

(72) 発明者 ゴフ ランダル エイ  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98021  
 ボセル トゥーハンドレッドアンドトゥエ  
 ンティフィフス ブレイス サウスイース  
 ト 508  
 (72) 発明者 ピーターソン デイル アール  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98021  
 ボセル トゥエンティエイス アベニュー  
 サウスイースト 18630  
 (72) 発明者 ポーター クリストファー エイチ  
 アメリカ合衆国 ワシントン州 98072  
 ウッディンヴィル ノースイースト ワン  
 ハンドレッドアンドトゥエンティセブンス  
 ブレイス 19756